

Fernanda Manuela Vieira Gonçalves

“Culturas celulares: uma ferramenta útil?”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Fernanda Manuela Vieira Gonçalves

“Culturas celulares: uma ferramenta útil?”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Fernanda Manuela Vieira Gonçalves

“Culturas celulares: uma ferramenta útil?”

---

Assinatura

Trabalho Apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Sumário**

As culturas celulares apareceram no século XX e têm vindo a evoluir como método de estudo e análise de patologias e de novos medicamentos para as combater.

Com o passar dos anos surgiram diferentes métodos de cultivo de células diversificando assim as culturas celulares em mono-camada, suspensas e imobilizadas.

Um dos propósitos das culturas celulares é a manipulação das células de modo a permitir a visualização das alterações celulares como o envelhecimento da célula (senescência), a apoptose, a necrose e a autofagia da célula.

Este método tem provado ser útil tanto no diagnóstico e tratamento de várias patologias como em doenças oncológicas, neuro-degenerativas ou do sistema imunitário

**Palavras-chave:** culturas celulares, células, tecidos e patologias.

## **Abstract**

Cell cultures appeared in the twentieth century and have been evolving as a study and analysis method of diseases and new medications to fight them.

Over the years there have been different methods of cell cultivation, diversifying as monolayer cell culture, suspended and immobilized.

One of the purposes of cell cultures is the manipulation of cells where cellular changes can be seen like the aging of the cell (senescence), apoptosis, necrosis and autophagy.

This method has proven to be useful in the diagnosis and treatment of various diseases such as oncological diseases, neuro-degenerative and immune.

**Keywords:** cell culture, cells, tissues and diseases.

## **Dedicatórias**

Dedico este trabalho com muito orgulho aos meus pais, irmãs e ao meu namorado, por todo o apoio, incentivo e paciência que me deram nestes últimos anos e principalmente nestes últimos meses. Sem a sua ajuda não estaria neste momento a acabar o mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas.

Aos meus avós, tios, amigos e mais uma vez, a ti Gaspar.

## **Agradecimentos**

À Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Pia por todo o apoio, conselhos e orientação.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Carla Martins Lopes pela paciência que teve ao ensinar como orientar a pesquisa e forma correta de fazer uma monografia.

À minha família e à Micaela.

A todos o meu obrigada por tudo.

## **Índice**

<b>I. Introdução</b>	<b>5</b>
1. O que são culturas celulares	5
2. História	6
3. Biologia das células para cultura	6
<b>II. Seleção da linha celular</b>	<b>8</b>
<b>III. Métodos gerais e parâmetros das culturas:</b>	<b>9</b>
1. Quantificação celular	9
2. Equipamento	9
3. Reagentes	10
<b>IV. Tipos de culturas</b>	<b>12</b>
1. Culturas em Mono-camada	12
2. Culturas suspensas	12
3. Culturas Imobilizadas	13
4. Culturas Tridimensionais	14
<b>V. Alterações celulares</b>	<b>17</b>
1. Senescência	17
2. Apoptose	17
3. Necrose	18

<b>VII. Engenharia dos tecidos</b>	<b>24</b>
<b>VIII. Aplicações</b>	<b>26</b>
<b>1. Patológicas</b>	<b>26</b>
i. Oncológicas	26
ii. Neuro-degenerativas	27
iii. Imunitárias	27
<b>2. Vacinação</b>	<b>29</b>
<b>X. Vantagens e desvantagens das culturas celulares em relação a testes in vivo</b>	<b>35</b>
<b>XI. Conclusão</b>	<b>36</b>
<b>XI. Bibliografia</b>	<b>37</b>



## Índice de figuras

Figura Nº 1: Diferentes métodos de imobilização celular. Adaptado de Pilkington <i>et al.</i> , 1998.	14
Figura Nº 2: Explicação dos processos de senescência e apoptose em células cancerígenas. Adaptado de Mooi e Peeper, 2006.	18
Figura Nº 3: Exemplificação dos processos que uma célula pode sofrer em stress. Adaptado de Proskuryakov <i>et al.</i> , 2003.	19
Figura Nº 4: Explicação do processo de autofagia devido à entrada de um microrganismo na célula. Adaptado de Campoy e Colombo, 2009.	20
Figura Nº 5: Várias fontes de contaminação da cultura com espécies de <i>Mycoplasma</i> diferentes. Adaptado de Nikfarjam e Farzaneh, 2012.	21
Figura Nº 6 Exemplificação geral do processo de formação de um tecido a partir de células, fatores de crescimento, hormonas, estimulação física, etc. Adaptado de Zhang <i>et al.</i> , 2009.	25
Figura Nº 7: Idade de prevalência do HPV em cinco zonas diferentes. Adaptado de Velicer <i>et al.</i> , 2009.	33
Figura Nº 8: Alterações celulares a nível imunológico devido ao envelhecimento. Adaptado de Dorrington e Bowdish, 2013.	34

## Índice de tabelas

Tabela Nº 1: Vantagens e desvantagens da utilização de culturas 3D. Adaptado de Yamada e Cukierman, 2007. 15

Tabela Nº 2: Comportamento celular dependente da cultura 3D. Adaptado de Yamada e Cukierman, 2007. 16

Tabela Nº 3: Resistências a antibióticos em infecções com *Mycoplasma*. Adaptado de Nikfarjam e Farzaneh, 2012. 22

Tabela Nº 4: Efeitos provocados nas células devido a infecções por *Mycoplasma spp.* Adaptado de Sokolova *et al*, 1998. 23

Tabela Nº 5: Esquema cronológico recomendado. Adaptado de direção geral de saúde, 2012. 29

## **I. Introdução**

### **1. O que são culturas celulares**

O talento para analisar células depende da capacidade de estas serem fácil ou dificilmente cultiváveis e manipuláveis ao nível laboratorial. Embora se trate de um processo complicado, existem várias técnicas que permitem cultivar ou manter as células isoladas, isto é, fora do organismo nativo, salvaguardando algumas das suas características (Hausman e Cooper, 2007).

Assim, é possível o cultivo celular a partir de tecidos humanos, animais e vegetais. No entanto, para que a utilização das células destes tecidos se torne viável, é necessário proceder-se previamente a uma desagregação, a qual poderá ser mecânica ou enzimática, do tecido original desencadeando a propagação celular numa suspensão ou numa camada aderente (Hausman e Cooper, 2007).

As culturas primárias são, tal como o nome indica, as primeiras culturas celulares de um determinado tecido. As células resultantes deste cultivo são depois transplantadas para uma nova cultura onde haja uma menor concentração, sendo designadas de culturas secundárias. Existem linhagens de células imortalizadas, isto é, células que crescem durante um longo período de tempo indefinido numa cultura (células tumorais, por exemplo) mas também existem células que só são capazes de se multiplicarem apenas um número reduzido de vezes, acabando por morrer (fibroblastos) (Hausman e Cooper, 2007).

As culturas celulares animais são de extrema importância já que permitem estudar os mecanismos que controlam o crescimento e a diferenciação celular, sendo também de grande relevância no combate a patologias como o cancro ou a doença de Alzheimer, sendo igualmente muito utilizadas na produção de biofármacos e em testes de eficácia de fármacos (Hausman e Cooper, 2007).

## 2. História

Há, aproximadamente, 3,8 bilhões de anos surgiu a vida na Terra, desconhecendo-se porém a sua origem ou a da primeira célula. Em meados de 1920, surge a ideia de que as moléculas orgânicas simples se podem polimerizar e formar macromoléculas. De acordo com os estudos realizados, a atmosfera terrestre primitiva era constituída maioritariamente por CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e alguns gases como H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub> e CO. Estas condições permitiram a formação de um ambiente redutor, no qual as moléculas orgânicas eram espontaneamente criadas, através do uso de uma fonte de energia como a luz solar. (Hausman e Cooper, 2007)

Existem dois tipos de células que se diferenciam pela sua organização (mais simples ou mais complexas) e pela presença ou ausência de núcleo. As células procarióticas são as mais pequenas e simples, com menos organização e não contêm núcleo propriamente dito enquanto que as células eucarióticas, mais complexas na organização dos seus organelos citoplasmáticos, contêm núcleo onde se encontra a informação genética e o citoesqueleto (Hausman e Cooper, 2007).

As culturas de células vegetais e animais são uma ferramenta importante e útil tanto para as investigações científicas como para comercialização (Thorpe, 2007).

No século XX, graças às investigações do cientista alemão Haberlandt, foram encontrados/desenvolvidos embriões e tecidos em culturas de raízes. Entre as décadas de 40 e 60, desenvolveram-se novas técnicas e aperfeiçoaram-se as existentes na época e, surgindo assim a cultura celular a qual permitiu, mais tarde, conhecer o comportamento celular (Thorpe, 2007).

## 3. Biologia das células para cultura

As células capazes de serem utilizadas para o crescimento são inúmeras e a utilização de marcadores específicos permite a identificação da linhagem que originou determinada célula (Freshney, 2000).

Existe uma contínua renovação das células-tronco, bem como da proliferação, da maturação e da diferenciação irreversível levando ao surgimento de linhas celulares heterogêneas, e nestes casos em algumas culturas podemos ter células-tronco, precursoras, maduras e diferenciadas (Freshney, 2000).

No entanto, também há culturas homogêneas, com células proliferativas de baixa densidade e outras de densidade elevada (Freshney, 2000).

Factores nutricionais como soro, iões de cálcio, interações na matriz celular, hormonas e densidade influenciam de várias maneiras a diferenciação e a proliferação (Freshney, 2000).

A proliferação celular é beneficiada com a baixa densidade celular, baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  esta entre 100-600mM e factores de crescimento, enquanto a diferenciação é beneficiada com a elevada densidade celular, esta deve ser superior a  $1 \times 10^5$  célula/cm<sup>2</sup>, a elevada concentração de cálcio, sendo esta concentração de 300 a 1500mM, hormonas como a hidrocortisona, indutoras da diferenciação e factores parácrinos (Freshney, 2000).

Deste modo e para ter um conjunto celular uniforme, torna-se necessário haver abordagens diferentes no que diz respeito à proliferação e diferenciação celular, uma vez que, dependendo da etapa, o crescimento celular carece de funções distintas a nível da densidade e das condições hormonais e nutricionais, sendo também muito importante escolher a linhagem a ser utilizada (Freshney, 2000).

## **II. Seleção da linha celular**

A melhor forma de obter uma linha celular em cultura para, por exemplo, observar a morfologia das células, é em pequena escala. Existem porém outras utilizações das culturas celulares que necessitam de uma maior quantidade de células, como a produção de vacinas virais e a obtenção de produtos celulares. (interferão, interleucina, etc) (Griffiths, 2000).

A produção de culturas celulares animais é um processo comum em biotecnologia, chegando a produzir-se em escalas superiores a 10000 litros, graças a um trabalho intensivo, moroso e dispendioso em que se reproduziram inúmeras culturas pequenas (Griffiths, 2000).

A cultura em suspensão é melhor para a produção em grande escala uma vez que a quantidade existente não levanta problemas, ou seja, se é maior ou menor no mesmo recipiente, havendo porém necessidade de se controlar o ambiente (temperatura e luz) bem como, de manter as condições fisiológicas favoráveis ao crescimento celular. Em mono-camada não é possível produzir uma grande quantidade num único recipiente, logo é necessário mais material (Griffiths, 2000).

### **III. Métodos gerais e parâmetros das culturas:**

#### **1. Quantificação celular**

A contagem total das células obtém-se facilmente através do hemocítômetro, no entanto, obter a medida da sua viabilidade é já mais complexo. (Griffiths, 2000)

A viabilidade celular pode ser avaliada através de um teste colorimétrico, isto é, através de corantes, procede-se à distinção entre células viáveis (não ficam coloridas), e não viáveis (permeáveis ao corante ficando coloridas). O azul de triptano é um corante muito usado neste tipo de teste, podendo no entanto manchar proteínas solúveis. Por isso, na presença de soro, é sempre preferível usar eritrosina B. Por outro lado, para proceder à análise dos resultados dever-se-á ter em atenção o pH devido ao corante e também à sua concentração.

Existe também uma medida indireta que se fundamenta na atividade metabólica em que se utiliza maioritariamente a glicose. Enquanto as células sofrem um crescimento logarítmico, a aproveitação de nutrientes e o número celular estão interligados. Noutras fases de crescimento podem ocorrer erros mais facilmente (Griffiths, 2000).

#### **2. Equipamento**

O equipamento utilizado para o crescimento celular animal é, por norma, de vidro, sendo substituído pelo aço inoxidável sempre que a grande quantidade de matéria o exija. O vidro boro silicatado poderá ser uma mais-valia visto que resiste melhor aos processos a que é submetido e é menos alcalino (Griffiths, 2000).

Normalmente, as células interagem com o material de contacto e no caso do vidro, estas interações podem ser diminuídas com tratamento de siliconagem (Griffiths, 2000).

O aço inoxidável utilizado com tubos de silicone apresenta uma desvantagem: os tubos absorvem facilmente os gases e perdem o dióxido de carbono dissolvido. Nestes casos,

devem ser usados materiais com um diâmetro de espessura relativamente maior, bem como reforços para garantir as condições de assepsia do meio (Griffiths, 2000).

Devem ser retiradas amostras frequentemente, com todo o cuidado necessário (dispositivos de recolha de amostras) de modo a não contaminar toda a cultura (Griffiths, 2000).

Os filtros de ar têm dois requisitos: a porosidade de 0,22 $\mu$ m e a impermeabilidade. Ambas são igualmente importantes para ser possível a entrada e saída de gases, bem como para manter a pressão interna (Griffiths, 2000).

É igualmente fundamental o uso de câmaras de fluxo laminar, estufas de CO<sub>2</sub>, centrífugas e microscópios óticos (Griffiths, 2000).

### 3. Reagentes

Na preparação do meio de cultura dever-se-á ter em conta reagentes como sais inorgânicos, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, tampões, antibióticos, fatores de crescimento e indicadores de pH (Griffiths, 2000).

Assim sendo, a carboximetilcelulose de sódio é utilizada em meios a 0,1% para preservar as células das possíveis deteriorações originadas pela agitação mecânica e apresenta uma solubilidade superior a 4°C do que a 37°C (Griffiths, 2000).

O Pluronic® F-68 tem como função controlar a espuma formada na agitação do meio e reduzir a afinidade das células ao material de vidro. É também útil na proteção das células em casos de estragos provocados pela agitação (Griffiths, 2000).

Segundo Yoon *et al* (2010) para avaliar as alterações provocadas pela cloroquina às células em cultura, utilizou-se uma linhagem de células designada de ARPE-19 e obtida na American Type Culture Collection, as quais foram cultivadas num ambiente com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina a 100IU/ml e 100 $\mu$ g/ml,



respetivamente. Incubou-se a 37°C com humidade de 5% de CO<sub>2</sub>. Ficando aptas para serem utilizadas quando atingem 80% de maturidade.

## IV. Tipos de culturas

### 1. Culturas em Mono-camada

Eagle *et al* (1955) descobriu como cultivar células animais num objeto sólido utilizando um meio de cultura líquido. Este é um método simples em que tanto se pode utilizar células primárias, como de primeira linha.

As células aderem à superfície sólida em que contactam e crescem formando uma camada contínua de células, estas células podem ser lavadas antes de se adicionar um meio fresco, esta é uma grande vantagem porque assim consegue-se eliminar um composto indesejável por exemplo, sem comprometer toda a cultura (Eagle, 1955) e (Griffiths, 2000).

As células podem ainda serem repicadas e cultivadas noutro meio, assim obtém-se uma linha celular homogénea e de fácil padronização (Eagle, 1955) e (Griffiths, 2000).

É também necessário utilizar a técnica asséptica para garantir o crescimento da cultura (Eagle, 1955).

### 2. Culturas suspensas

Embora mais morosas, as culturas suspensas são um ótimo método para obter resultados homogéneos em grande escala (Griffiths, 2000).

Há tipos de células que se adaptam melhor neste tipo de cultura, como é o caso das hematopoéticas, outras há que podem ser ajustadas. Nestes casos realiza-se uma abordagem diferente (seleção e adaptação) de modo a possibilitar a obtenção de uma linha celular em suspensão (Griffiths, 2000).

Em primeiro lugar, é necessário proceder a uma separação de células cultivadas em mono-camada com tripsina (0,1%), adiciona-se depois ao meio de cultura o cálcio e o magnésio (Griffiths, 2000).

A contagem das células deve ser efetuada a cada 24 e 36 horas, devendo-se remover o meio após centrifugação e adicionar um meio fresco. Seguidamente, verificar-se-á o êxito da cultura, ou seja, tornar-se-á evidente ou não o normal crescimento das células. (Griffiths, 2000).

### 3. Culturas Imobilizadas

Nos últimos anos, as culturas celulares imobilizadas foram alvo de grandes progressos devido às vantagens que apresentam, sendo de destacar o seu uso prolongado, a sua estabilidade e densidade celular mais elevada (Covizzi *et al.*, 2007).

A imobilização propriamente dita, pode ser realizada fisicamente (as células não têm liberdade para se moverem devido a encontrarem-se retidas no interior do agente imobilizador, como por exemplo, glóbulos e proteínas) ou ficarem aderidas à superfície de suporte por ligações químicas (covalentes) (Canilha *et al.*, 2006).

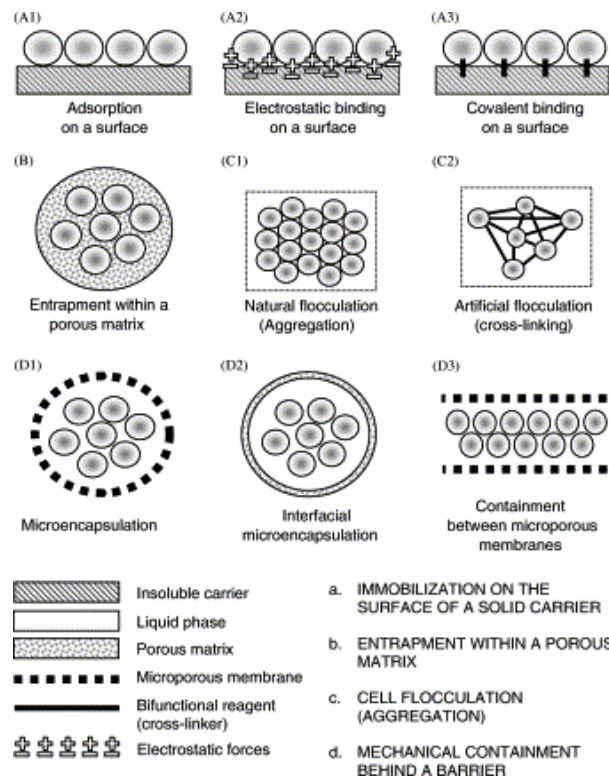


Figura Nº 1: Diferentes métodos de imobilização celular. Adaptado de Pilkington *et al.*, 1998.

As desvantagens associadas a estas culturas são geralmente associadas aos custos e à matriz, uma vez que esta poder-se-á desintegrar, logo os métodos inerentes são de extrema importância para o sucesso da cultura (Covizzi *et al.*, 2007) e (Canilha *et al.*, 2006).

#### 4. Culturas Tridimensionais

Atualmente procura-se aproximar cada vez mais os resultados *in vitro* com os *in vivo* sendo as culturas tridimensionais as que se empenham em obter resultados mais fidedignos devido às suas características (Yamada e Cukierman, 2007).

Tanto os testes realizados em animais como as culturas em 2D foram e são bastante importantes no avanço e estudo das células, das patologias e da terapêutica. No entanto, as 3D dentro do possível oferecem um meio mais semelhante à realidade (Birgersdotter

*et al.*, 2005; Cukierman *et al.*, 2002; Griffith e Swartz, 2006; Nelson e Bissell, 2006; Knight e Shokat, 2007).

Para realizar estas culturas podem ser utilizados tecidos, células e linhas de células que não perdem o seu formato 3D (Gahwiler *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2003).

Vantagens	Desvantagens
A morfologia e a sinalização são mais fisiológicas comparativamente às células 2D	Condições <i>in vivo</i> podem variar
Manipulação e testes menos morosos	Propicia a escassez de nutrientes, oxigénio, interações célula-a-célula
Imagens microscópicas reais com qualidade superior	Falta de progressão a longo prazo comparativamente ao sistema <i>in vivo</i>

Tabela N° 1: Vantagens e desvantagens da utilização de culturas 3D. Adaptado de Yamada e Cukierman, 2007.

Segundo Debnath e Brugge (2005), Nelson e Bissell (2006) equiparando os dois modelos, *in vivo*, as 3D revelam melhores resultados quanto à organização, sinalização e secreção de células glandulares epiteliais.

<b>Função biológica</b>	<b>2D vs 3D</b>	<b>Mecanismos regulatórios</b>
Forma da célula	Perda de polaridade celular epitelial e alteração da forma epitelial e dos fibroblastos em 2D	Recetores de fator de crescimento; sinais de adesão celular associada com a sobrevivência das células e plasticidade da matriz
Expressão Genética	Células em 2D tem padrões de expressão genética diferentes	Hormonas e moléculas de adesão
Crescimento	Crescimento celular dependente da regulação da matriz 3D	Fatores relacionados com a adesão e crescimento ou genes apoptóticos
Morfogênese	Crescimento do recipiente e ramificação da glândula induzida pela matriz 3D	Adesão, fatores relacionados com o crescimento e genes apoptóticos
Motilidade	Padrões de motilidade de células individuais e coletivas alterados em matrizes 3D	Fatores relacionados com a adesão e crescimento; fosfolípidos
Diferenciação	Diferenciação celular induzida por matriz 3D	Fatores de crescimento; moléculas motoras

Tabela Nº 2: Comportamento celular dependente da cultura 3D. Adaptado de Yamada e Cukierman, 2007.

## **V. Alterações celulares**

### **1. Senescência**

A senescência, sendo um sistema que envolve uma ativação génica, é essencial ao envelhecimento celular (Mooi e Peeper, 2006).

Os telómeros são destruídos e os genes supressores tumorais são restituídos. Consequentemente, as células que sofrem esta alteração livram-se da aptidão proliferativa, tornando-se cada vez menos capazes de se dividirem e formarem novas células (Mooi e Peeper, 2006).

### **2. Apoptose**

A apoptose também designada por morte celular programada, é um método importantíssimo porque elimina células anormais permitindo a evolução do organismo (Grivicich *et al.*, 2007).

Para ocorrer apoptose, a célula perde a sua morfologia devido à ocorrência da retração, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, entre outros processos de transformação. As moléculas responsáveis por esta alteração são as caspases e algumas proteínas (Grivicich *et al.*, 2007).

Desde que se procedeu a este método, houve uma nova esperança no tratamento de doenças oncológicas pois tenta-se induzir a apoptose nas células cancerígenas (Grivicich *et al.*, 2007).

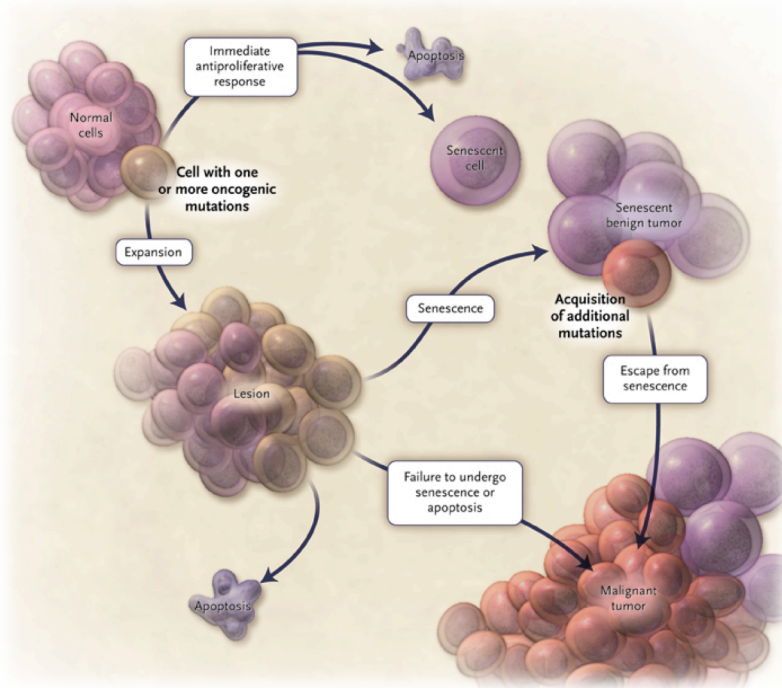


Figura Nº 2: Explicação dos processos de senescência e apoptose em células cancerígenas. Adaptado de Mooi e Peeper, 2006.

### 3. Necrose

Na necrose verifica-se um elevado crescimento celular devido a aglomeração da cromatina, advém também uma desarrumação no citoplasma em que a membrana é corrompida originando a rutura da célula. Os organelos celulares são excretados, podendo influenciar as células que se encontram à sua volta (Ziegler e Groscurth, 2004).



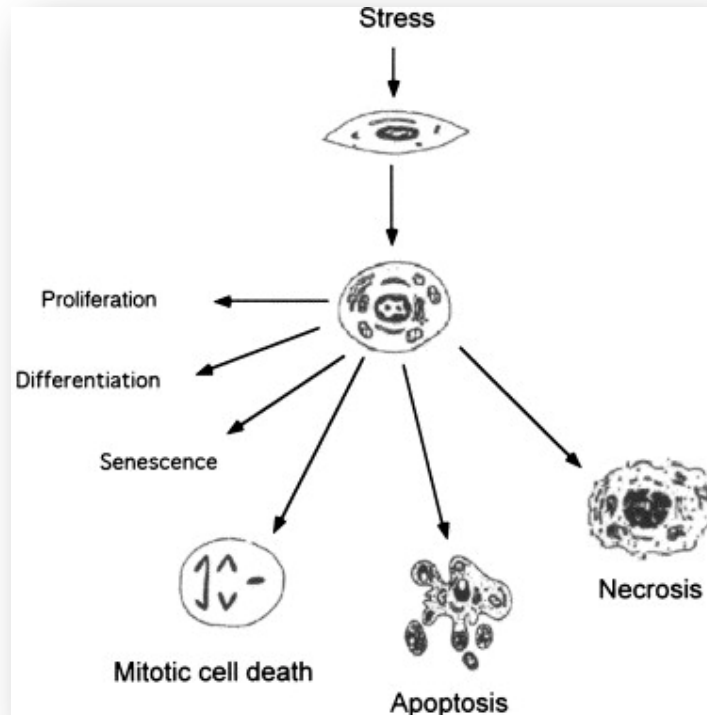


Figura Nº 3: Exemplificação dos processos que uma célula pode sofrer em stress. Adaptado de Proskuryakov *et al.*, 2003.

#### 4. Autofagia

A autofagia caracteriza-se pela eliminação de organelos desnecessários ao bom funcionamento da célula, assim sendo, ocorre a criação de uma membrana que vai envolver o organelo em questão, formando um autofagossoma. Através da ajuda de enzimas hidrolíticas, o organelo é degradado (Danial e Korsmeyer, 2004) e (Lum *et al.*, 2005).

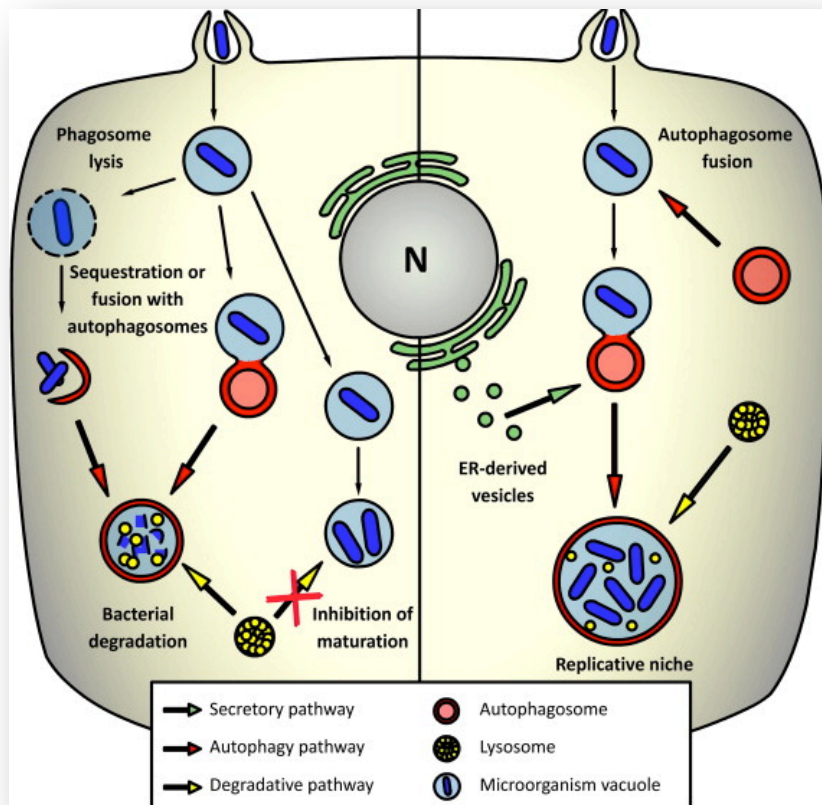


Figura Nº 4: Explicação do processo de autofagia devido à entrada de um microrganismo na célula. Adaptado de Campoy e Colombo, 2009.

## VI. Contaminação da cultura celular

Com o crescimento exponencial que as culturas celulares têm sofrido a nível industrial e terapêutico, torna-se necessário ter em atenção as possíveis contaminações a que podem estar sujeitas (Nikfarjam e Farzaneh, 2012).

A contaminação mais problemática é a infeção provocada por *Mycoplasma spp.* porque afeta a viabilidade celular, embora as infeções bacterianas e fúngicas sejam também relevantes, no entanto, estas são detetadas precocemente (Nikfarjam e Farzaneh, 2012).

As contaminações podem ter várias fontes como o uso de soro animal nas culturas, o uso incorreto do material, o simples pipetar com a boca, material e soluções mal esterilizadas. Seja como for, é importante saber que uma única cultura contaminada pode contaminar outras culturas quer estejam em laboratório (Nikfarjam e Farzaneh, 2012).

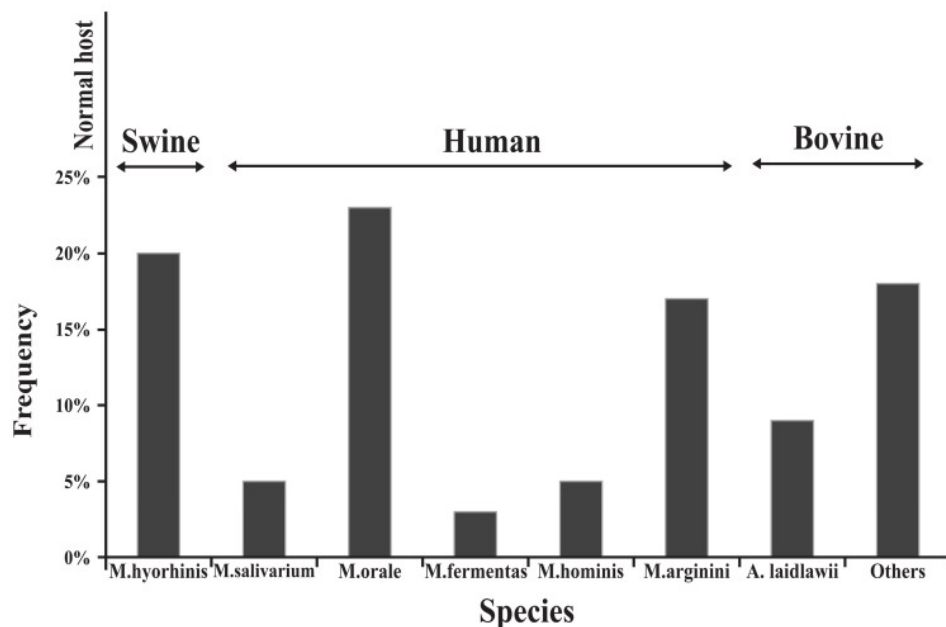


Figura Nº 5: Várias fontes de contaminação da cultura com espécies de *Mycoplasma* diferentes. Adaptado de Nikfarjam e Farzaneh, 2012.

O *Mycoplasma spp.* é difícil de eliminar com antibióticos comuns, uma vez, que apresenta resistência a vários deles (Nikfarjam e Farzaneh, 2012).

Antibiotic	Resistance
Chloramphenicol	30%
Chlortetracycline	11%
Ciprofloxacin	15%
Erythromycin	98%
Gentamicin	80%
Kanamycin	73%
Lincomycin	28%
Neomycin	86%
Spectinomycin	14%
Streptomycin	88%
Tetracycline	14%

Tabela Nº 3: Resistências a antibióticos em infecções com *Mycoplasma*. Adaptado de Nikfarjam e Farzaneh, 2012.

Dever-se-á implementar laboratorialmente regras rigorosas como uma boa técnica asséptica, utilizar células de bancos de células confiáveis e também, utilizar antibióticos com moderação (pois o seu uso continuado pode suscitar e desenvolver novas resistências) de modo a evitar este tipo de contaminações (Uphoff e Drexler, 2002).

Segundo Ben-Menachem (2001), as infecções provocadas pelo *Mycoplasma spp.* tem efeitos nefastos nos resultados já que poderá originar a perda da própria cultura, alterações celulares como a deterioração, a apoptose, o crescimento celular alterado com viabilidade diminuída.

Increased sensitivity to apoptosis
Chromosomal aberrations
Change of gene expression patterns
Changes in cell membrane antigenicity
Inhibition of cell growth
DNA fragmentation due to mycoplasma nucleases
Compromised production of viruses
Inhibition of cell metabolism
Reduction of transfection efficiencies
Cell death

Tabela N° 4: Efeitos provocados nas células devido a infecções por *Mycoplasma spp.*  
Adaptado de Sokolova *et al.*, 1998.

Assim sendo, estas infecções após a sua disseminação são difíceis de controlar devido às características de invisibilidade que o *Mycoplasma spp.* apresenta. Estas contaminações podem variar de acordo com o operador, material e exigência da técnica assética (Nikfarjam e Farzaneh, 2012).

## VII. Engenharia dos tecidos

A engenharia dos tecidos é a ciência que estuda a criação de partes do organismo humano como tecidos e órgãos a partir de células exógenas. Segundo Lanza *et al* (2007) esta ciência é a base de uma contínua evolução na tentativa de substituir um órgão ou tecido utilizando células vivas. Estas necessitam de um modelo para que a sua aceitação pelo sistema imunitário do organismo seja possível e para que o crescimento da matriz, neste caso, tecido celular ou órgão seja viável.

É uma área que tenta respeitar a natureza no que diz respeito à transplantação porque não são usados órgãos ou tecidos de um dador (Lanza *et al.*, 2007).

As células tanto podem ser diferenciadas como programadas para realizarem objetivos apenas na presença de alguns sinalizadores (Lanza *et al.*, 2007).

Esta ciência é muito minuciosa no que diz respeito aos processos que lhe são inerentes, já que é necessário um estudo detalhado do tipo de células que vão ser utilizadas, podendo estas ser do doente e por isso imunologicamente aceites, ou de um dador mais propícias à rejeição imunológica, ou até mesmo de um animal sendo estas as que apresentam um risco de rejeição maior (Vacanti e Vacanti, 2007).

O transplante pode ser realizado de duas formas distintas, *in vivo* ou *in vitro*, querendo isto dizer que *in vivo*, as células escolhidas são inseridas no organismo podendo apresentar algum nível de diferenciação ou não, para realizarem a função e se diferenciarem no próprio hospedeiro, enquanto que no processo *in vitro*, as células são cultivadas numa cultura celular ou em bioreatores com o intuito de formar o tecido e este ser transplantado após a sua formação (Vacanti e Vacanti, 2007).

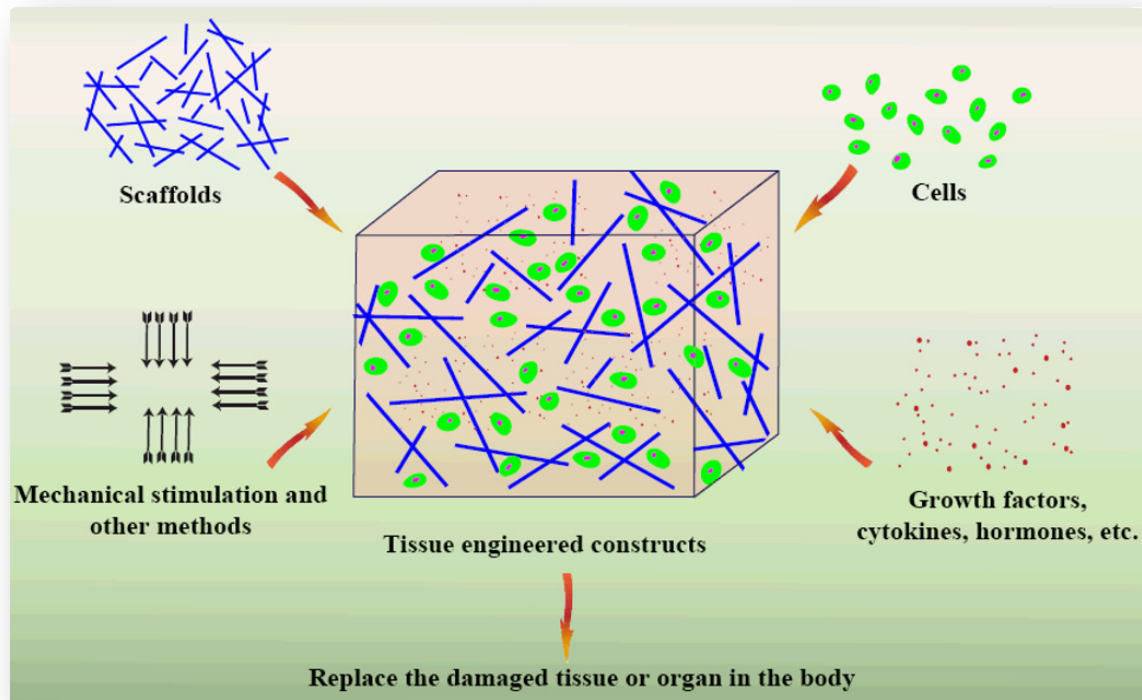


Figura Nº 6 Exemplificação geral do processo de formação de um tecido a partir de células, fatores de crescimento, hormonas, estimulação física, etc. Adaptado de Zhang *et al.*, 2009.

Assim sendo, a engenharia de tecidos tem como intuito principal a substituição de órgãos ou tecidos que foram atingidos por alguma patologia ou trauma e que por isso, perderam a sua funcionalidade (Lanza *et al.*, 2007).

## VIII. Aplicações

### 1. Patológicas

A formação de uma cultura celular pode ser uma das estratégias utilizada no tratamento de diversas patologias. Existem várias doenças ou problemas de saúde que podem ser controlados graças ao recurso a esta técnica que têm sido reportada ao longo dos tempos.

Existem alguns exemplos de células estaminais que foram usadas para tratamento de lesões medulares, reparação e recuperação da lesão da função do sistema nervoso central (Piltti *et al.*, 2013), tratamento de cancro do estômago (Zieker *et al.*, 2013), tratamento de esquizofrenia, de transtorno bipolar e autismo (Panchision, 2013), ou ainda do carcinoma hepatocelular (Knoop *et al.*, 2013).

#### i. Oncológicas

O cancro tem evoluído afetando cada vez mais as populações, logo as investigações para descobrir tratamentos eficazes tanto na cura com na sua prevenção é constante (Mahassni e Al-Reemi, 2013).

Vários estudos afirmam que manter um estilo de vida saudável, ter uma boa alimentação e praticar de exercício físico, diminui a probabilidade de desenvolver cancro ao longo da vida (Anand *et al.*, 2008).

A terapêutica oncológica existente é variada e dispendiosa e, nos últimos anos, a procura por uma terapêutica sem recurso a químicos e a radiações, com vista a minimizar os danos provocados por estes, tem crescido exponencialmente (Mahassni e Al-Reemi, 2013).

As culturas celulares desempenham assim um papel fundamental no que diz respeito aos resultados destas terapias (Mahassni e Al-Reemi, 2013).



Em relação ao cancro da mama, estuda-se a atividade da planta *Lepidium sativum* vulgarmente conhecida como agrião (Mahassni e Al-Reemi, 2013).

Mahassni e Al-Reemi (2013) avaliaram os estados de apoptose e necrose em células cancerígenas comparativamente a fibroblastos normais induzidos pelo extrato de *Lepidium sativum* e limitaram os resultados pelas alterações morfológicas observadas através de microscopia ótica e de fluorescência, citometria de fluxo e fragmentação de DNA.

Os resultados deste estudo mostram que ambas as culturas sofrem apoptose, especialmente a cultura de células cancerígenas quando tratada com extrato a 25 e 50% enquanto que a necrose, apenas quando a concentração é bastante elevada a 75%. (Mahassni e Al-Reemi, 2013).

## ii. Neuro-degenerativas

As culturas celulares podem ser uma mais valia no tratamento de determinadas doenças e/ou na melhoria da qualidade de vida de alguns doentes. Exemplo disso é o recurso a culturas celulares em animais, na esperança de encontrar uma alternativa para melhorar a qualidade de vida de pacientes com Alzheimer uma doença atualmente sem cura, mas para a qual existe tratamento. Estas culturas têm sido também utilizadas para testar a eficácia de fármacos eficazes na prevenção, redução e até mesmo reversão da insuficiência sináptica característica das doenças degenerativas (Trinchese *et al.*, 2004).

Desta forma, é possível melhorar a saúde, retardar o declínio cognitivo, controlar as alterações de comportamento mais rapidamente e com maior eficácia (Trinchese *et al.*, 2004).

## iii. Imunitárias

As culturas celulares podem ser aplicadas em variadas situações. Têm sido realizados alguns estudos com culturas celulares de origem vegetal utilizando-se algumas isoflavonas de soja, tais como a genisteína e a daidzeína. Estas substâncias têm

demonstrado efeitos para uma eventual intervenção no tratamento da diabetes, essencialmente da diabetes tipo 2 (Esteves e Monteiro, 2001).

A genisteína tem sido estudada em culturas celulares como um composto inibidor das proteínas tirosina quinases (receptores para a insulina) e a sua ligação a estes receptores promove um aumento da secreção de insulina. A daidzeína tem um mecanismo de atuação diferente do da genisteína, no entanto, tem sido observado que esta isoflavona promove um aumento da secreção de insulina proporcional à genisteína. (Esteves e Monteiro, 2001).

Estes estudos são importantes devido à alta incidência desta doença e podem contribuir para o seu controle através de uma alternativa não medicamentosa (Esteves e Monteiro, 2001).

## 2. Vacinação

Em 1950 houve um grande crescimento das culturas celulares devido à procura de vacinas, nomeadamente a vacina para a poliomielite (Butler, 2005).

A vacinação é uma terapêutica muito importante na prevenção de várias patologias e desde que o plano nacional de vacinação entrou em vigor, foi notória uma diminuição significativa na incidência das patologias abrangidas por este plano (Direção Geral de Saúde, 2012)

Assim sendo, este plano abrange toda a população portuguesa e apresenta esquemas de acordo com as idades e necessidades de cada indivíduo (Direção Geral de Saúde, 2012).

Vacina contra:	Idades								
	0 Nasci- mento	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	18 meses	5-6 anos	10-13 anos	Toda a vida 10/10 anos
Tuberculose	BCG								
Hepatite B	VHB 1	VHB 2		VHB 3					
Haemophilus influenzae b		Hib 1	Hib 2	Hib 3		Hib 4			
Difteria -Tétano - Tosse Convulsa		DTP <sub>a</sub> 1	DTP <sub>a</sub> 2	DTP <sub>a</sub> 3		DTP <sub>a</sub> 4	DTP <sub>a</sub> 5	Td	Td
Poliomielite		VIP 1	VIP 2	VIP 3			VIP 4		
Meningococo C (a)					MenC 1				
Sarampo - Parotidite epidémica - Rubéola					VASPR 1		VASPR 2		
Infecções por vírus do Papiloma humano (b)								HPV 1; 2; 3 13 anos	

Tabela Nº 5: Esquema cronológico recomendado. Adaptado de Direção Geral de Saúde, 2012.

Existem dois tipos de vacinas, as inativadas que contêm partes de microrganismos inativados laboratorialmente ou parte da informação genética incapaz de causar doença e as atenuadas/vivas em que o microrganismo é manipulado laboratorialmente até que as suas defesas fiquem em baixo mas que mantenham as suas características sendo estas, por isso, mais eficazes (Direção geral de saúde, 2012) e (Prutsky, *et al.*, 2012).

No plano nacional de vacinação temos estes dois tipos de vacinas: as inativadas, por exemplo, contra a difteria, o tétano e HPV e as atenuadas: por exemplo, contra a poliomielite, o sarampo e a rubéola (Direção Geral de Saúde, 2012) e (Prutsky, *et al.*, 2012).

Dependendo do tipo da vacina em questão, dever-se-à ter em atenção o tempo de administração entre elas, ou seja:

<b>Tipos de vacinas</b>	<b>Intervalo mínimo recomendado</b>
Maior ou igual a duas inativadas	Normalmente, podem ser administradas no mesmo dia ou sem intervalo entre as doses
Inativadas e atenuadas	Normalmente, podem ser administradas no mesmo dia ou sem intervalo entre as doses
Maior ou igual a duas atenuadas	Podem ser administradas no mesmo dia ou com um intervalo de quatro semanas no mínimo.

Tabela Nº 6: Intervalos entre a administração de vacinas diferentes. Adaptado de Direção Geral de Saúde, 2012.

#### Vacina contra a tuberculose (BCG):

É constituída por bacilos vivos atenuados e atua na estimulação do sistema imunitário, ou seja, a dose administrada vai fazer com que haja uma resposta ativa do sistema imunológico do indivíduo. Tratando-se de uma resposta eficaz, não provoca doença e o indivíduo permanece imune à *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, têm sido estudadas novas formas de vacinação para atingir o objetivo de, até 2050, eliminar esta doença (Kaufmann *et al.*, 2010).

#### Vacina contra a hepatite B (VHB):

Contém um antígeno de superfície recombinante do VHB (vírus da hepatite B) e cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo estão infectadas com o VHB, portanto devem ser estimuladas a desenvolver cuidados de modo a evitar a transmissão para outras pessoas tais como o/a parceiro/a sexual, o/a qual deverá ser vacinado/a ou usar um método contraceptivo de barreira e não doar sangue nem órgãos (Lavanchy, 2004).

É extremamente importante que as crianças sejam vacinadas à nascença que recebam o reforço aos 2 e 6 meses de modo a prevenir que sejam infectadas (Mast *et al.*, 2005).

#### Vacina contra a doença invasiva provocada por *Haemophilus influenzae b* (Hib):

É constituída por oligossacarídeos ou polissacarídeos capsular do *Haemophilus influenzae b* (Hib) e é responsável por diversas patologias invasivas como a pneumonia, a meningite, a osteomielite, entre outras. A vacina contra a doença invasiva por *Haemophilus influenzae B* deve ser administrada aos 2, 4, 6 e 18 meses já que são o grupo com mais predisposição a contrair este tipo de bactéria e, consequentemente, as patologias que ela provoca (Bricks, 1998).

Vacina trivalente contra a tosse convulsa, difteria e tétano:

Esta vacina previne o aparecimento destas três patologias, sendo que a tosse convulsa é de difícil prevenção porque pode surgir passados alguns anos, numa faixa etária avançada. É constituída por toxóides adsorvidos e *Bordetella pertussis* (Direção Geral de Saúde, 2012) e (Cortese, 2006).

Vacina contra a poliomielite (VIP):

Em 2002 no “15th Meeting of the Regional Commission for the Certification of Polio Eradication” realizado em Copenhaga, afirmou-se que os países europeus estavam livres da poliomielite (Gonçalves, 2003).

A vacina contra a poliomielite tanto pode ser inativada (injetável) ou atenuada (via oral) mas a administrada em Portugal é a inativada e em ação contra os tipos 1, 2 e 3 do vírus (Direção Geral de Saúde, 2012) e (Gonçalves, 2003).

Vacina contra a doença invasiva por *Neisseria meningitidis C* (MenC):

É constituída por oligossacarídeos ou polissacarídeos capsular de *Neisseria meningitidis C* e, desde a penúltima atualização do plano nacional de vacinação de 2006 até à última atualização realizada em 2012, sofreu alteração a nível da dosagem a administrar, passando de três a uma única dose aos 12 meses, a partir de 2012 (Direção geral de saúde, 2012).

Vacina trivalente contra o sarampo, parotidite epidémica e a rubéola (VASPR):

Esta vacina é composta por vírus vivos atenuados que provocam este tipo de patologias e é administrada aos 12 meses, sendo reforçada aos 5/6 anos, ou seja, no período de entrada para a escola (Direção Geral de Saúde, 2012).

Quando surgiu, este tipo de vacina era inativada, mas rapidamente se percebeu que, com o uso de uma atenuada, os resultados eram significativamente melhores (Stittelaar, 2002).

Vacina tetravalente contra infecções por vírus do papiloma humano (HPV):

A vacina contra o HPV é constituída por proteínas L1 dos tipos 6, 11, 16 e 18 do vírus, sendo o tipo 16 o mais comum. O HPV provoca o cancro do colo do útero que é uma das principais causas de morte nas mulheres, em todo o mundo (Jemon *et al.*, 2013).

Ao nível de prevenção, a vacina é de grande importância tal como os fatores ambientais, a predisposição do indivíduo a desenvolver infecções, genéticas e/ou sexuais (Ezat *et al.*, 2013) e (Malogajski *et al.*, 2013).

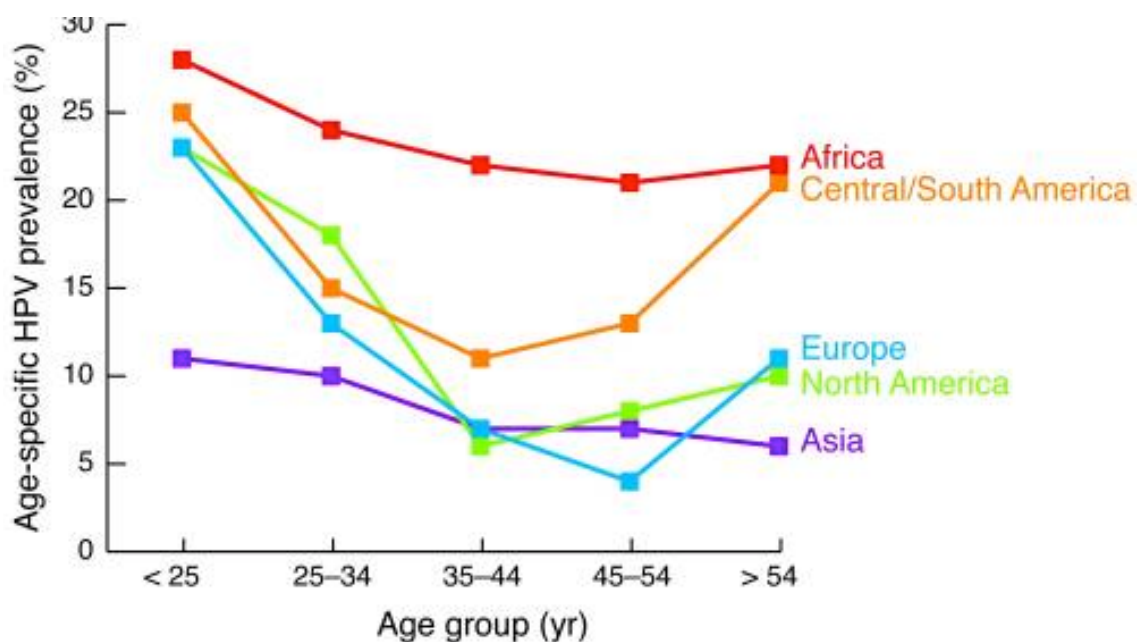


Figura Nº 7: Idade de prevalência do HPV em cinco zonas diferentes. Adaptado de Velicer *et al.*, 2009.

A vacinação continua hoje em dia a ser uma mais-valia na promoção de saúde pública e na erradicação de algumas patologias. Existem muitas outras vacinas não inseridas no Plano Nacional de Vacinação, mas de extrema importância (Direção Geral de Saúde,

2012) e (Dorrington e Bowdish, 2013).

Uma das limitações das vacinas é que vão perdendo eficácia à medida que o utente envelhece, esta é uma barreira que se está a tentar resolver (Dorrington e Bowdish, 2013).

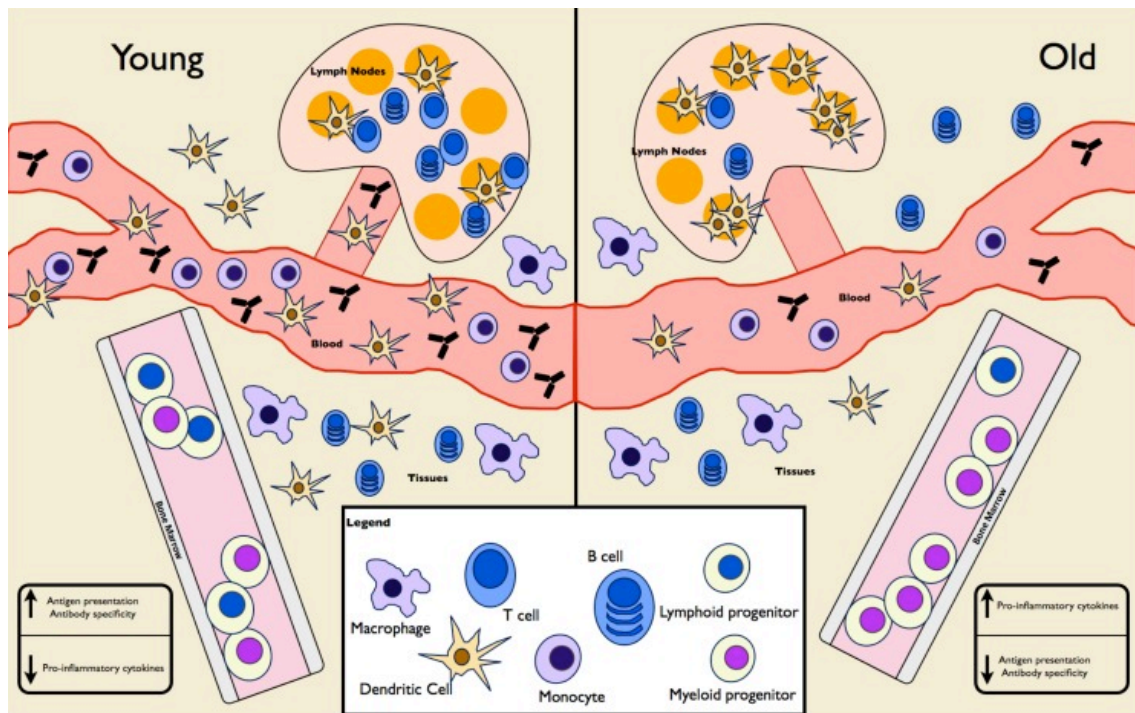


Figura Nº 8: Alterações celulares a nível imunológico devido ao envelhecimento. Adaptado de Dorrington e Bowdish, 2013.



## **X. Vantagens e desvantagens das culturas celulares em relação a testes in vivo**

O uso de animais vivos em ensaios laboratoriais tem sido um fator de grande controvérsia ao longo dos anos, por isso tende a evitar-se estes ensaios. Hoje em dia, começam a surgir alternativas eficazes como é o caso das linhas celulares em cultura (Cerqueira, 2008).

Vantagens: menor custo; espaço de armazenamento menor (relativamente ao dos animais); maior facilidade na manipulação de dados (Cerqueira, 2008).

As desvantagens são poucas e prendem-se com o facto da substância que está a ser testada não interagir diretamente com um organismo vivo (Cerqueira, 2008). Também o facto de serem facilmente contaminadas com agentes externos, já referido anteriormente, no caso das infeções por *Mycoplasma spp* (Nikfarjam e Farzaneh, 2012).

A dermocosmética foi pioneira no uso de culturas celulares como alternativa à realização de testes em animais. Para os seus ensaios utilizam grupos de pessoas voluntárias e consultam ensaios realizados anteriormente (Cerqueira, 2008).

## **XI. Conclusão**

De acordo com os resultados encontrados em vários estudos foi possível concluir que as culturas celulares são ferramentas úteis no tratamento de várias doenças. No entanto, são alvo de investigação futura, visto que ainda há muito por explorar de modo a poder tirar maior partido destes elementos.

As culturas celulares são vantajosas, uma vez que podem ser alcançados melhores resultados no tratamento de várias doenças, nomeadamente, doenças oncológicas, neuro-degenerativas e imunitárias, assim como apresentam inúmeras vantagens na vacinação.

Esta ferramenta pode também ser uma mais valia em termos de diagnóstico, prevenção de forma a evitar o mais temível dos cenários, a morte por doença.

O recurso às culturas celulares será certamente importante para o desenvolvimento da engenharia de tecidos, uma ciência em constante evolução, necessária para a substituição de órgãos ou tecidos danificados.

Verificaram-se vantagens ao longo da sua utilização, tal como a possibilidade de estudar fenómenos inacessíveis em tecidos intactos e permitir economizar recursos e tempo. Para além destas vantagens, estas culturas podem ainda ser utilizadas como um instrumento útil para testar a eficácia de determinado tratamento farmacológico.

Culturas celulares: uma ferramenta útil?

Sem dúvida, desde que bem explorada. Ao serviço da humanidade e da natureza.

## XI. Bibliografia

Anand, P. *et al.* (2008). Curcumin and cancer: an “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters*, 267, pp. 133-164.

Ben-Menachem, G. *et al.* (2001). Choline deficiency induced by Mycoplasma fermentans enhances apoptosis of rat astrocytes. *FEMS microbiology letters*, 201, pp. 157-162.

Birgersdotter *et al.* (2005). Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in cancer biology*, 15, pp. 405-412.

Bricks, L. (1998). Análise crítica sobre o uso das vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* do tipo b em diferentes países. *Departamento de pediatria FMUSP*, 20, pp. 216-229.

Butler, M. (2005). Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology*, 68, pp. 283-291.

Campoy, E. e Colombo, M. (2009). Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochimica et biophysica acta – Molecular cell research*, 1793, pp. 1465-1477.

Canilha, L. *et al.* (2006). Biocatalizadores imobilizados. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*, 36, pp. 48-52.

Cerqueira, N. (2008). Experimentação animal. *Sociedade brasileira para o progresso da ciência*, 60, pp. 47-49.

Cortese, M. *et al.* (2006). Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines. *MMWR recommendations and reports*, 55, pp. 1-34.

Covizzi, L. *et al.* (2007). Ciências exactas e tecnologias. *Londrina*, 28, pp. 143-146.

Cukierman, E. *et al* (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology*, 14, 633–639.

Danial, N. e Korsmeyer, S. (2004). Cell death: critical points. *Cell*, 19, pp. 116-125.

Debnath, J. e Brugge, J. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature reviews cancer*, 5, pp. 675–688.

Direção geral de saúde Homepage. [Em linha]. Disponível em <http://www.dgs.pt>. [Consultado em 07/07/2013].

Dorrington, M. e Bowdish, D. (2013). Immunosenescence and Novel Vaccination Strategies for the Elderly. *Frontiers in immunology*, 4, pp. 1-10.

Eagle, H. (1955). Nutricional needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 130, pp. 425-432.

Esteves, E. e Monteiro, J. (2001). Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em donças crónicas. *Revista de nutrição*, 14 (1), pp.43-52.

Ezat, S. *et al.* (2013). National HPV Immunisation Programme: Knowledge and Acceptance of Mothers Attending an Obstetrics Clinic at a Teaching Hospital, Kuala Lumpur. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 14, pp. 2991-2999.

Freshney, R. (2000). Introduction to basic principles. In: Masters, J. (Ed.). *Animal Cell Culture: a practical approach*. 3ª Edição. New York, Oxford University Press, pp. 2-3.

Gahwiler, B. *et al.* (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends neuroscience*, 20, pp. 471–477.

Gonçalves, G. *et al.* (2003). Portugal e a Europa livres da poliomielite. *Acta médica portuguesa*, 16, pp. 33-39.

Griffiths, B. (2000). Scaling up of animal cell cultures. In: Masters, J. (Ed.). *Animal Cell Culture: a practical approach*. 3ª Edição. New York, Oxford University Press, 19-22.

Griffith, L. e Swartz, M. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews molecular cell biology*, 7, 211–224.

Grivicich *et al.* (2007). Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia*, 53(3), pp. 336-337.

Hausman, R. e Cooper, G. (2007). *A célula: uma abordagem molecular*. Porto Alegre, Artmed, pp. 30-32.

Jemon, K. *et al.* (20013). An Enhanced Heterologous Virus-Like Particle for Human Papillomavirus Type 16 Tumour Immunotherapy. *Plos One*, 8, pp. 1-12.

Kaufmann, S. *et al.* (2010). New vaccines for tuberculosis. *Lancet*, 375, pp. 2110-2119.

Knight, Z. e Shokat, K. (2007). Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet. *Cell*, 128, pp. 425–430.

Knoop, K. *et al.* (2013). Stromal targeting of sodium iodide symporter using mesenchymal stem cells allows enhanced imaging and therapy of hepatocellular carcinoma. *Human Gene Therapy*.

Lanza, R. *et al.* (2007). *Principles of tissue engineering*. 3ª Edição. London, Elsevier.

Lavanchy D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of virus hepatitis*, 11, pp. 97-107.

Lum, J. et al. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews molecular cell biology*, 6, pp. 439-448.

Mahassni, S. e Al-Reemi, R. (2013). Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds. *Saudi journal of biological sciences*, 20, pp. 131-139.

Malogajski, J. et al. (2013). Translational Potential into Health Care of Basic Genomic and Genetic Findings for Human Immunodeficiency Virus, Chlamydia trachomatis, and Human Papilloma Virus. *Biomed research international*, 2013, pp. 1-10.

Mast, E. et al. (2005). A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR recommendations and report*, 54, pp. 1-31.

Mooi, W. e Peeper, D. (2006). Oncogene-induced cell senescence – halting on the road to cancer. *England journal med*, 355, pp. 1037-1046.

Nelson, C. e Bissell, M. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and development biology*, 22, 287–309.

Nikfarjam, L. e Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture. *Cell*, 13, pp. 203-212.

Panchision, D.M. (2013). Meeting report: using cells for biological and therapeutics discovery in mental illness. *Stem Cells Translational Medicine*.

Pilkington, P. *et al* (1998) Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the institute of brewing*, Londres, 104, 19-31.

Piltti, K.M. *et al.* (2013). Safety of Epicenter Versus Intact Parenchyma as a Transplantation Site for Human Neural Stem Cells for Spinal Cord Injury Therapy. *Stem Cells Translational Medicine*.

Proskuryakov, S. *et al.* (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research*, 283, pp. 1-16.

Prutsky, G. *et al.* (2012). Influenza vaccines licensed in the United States in healthy children: a systematic review and network meta-analysis (Protocol). *Sistematic reviews*, 65, pp. 1-7.

Sakai, T. *et al.* (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*, 423, pp. 876–881.

Sokolova, I. *et al.* (1998). Mycoplasma infection can sensitize host cells to apoptosis through contribution of apoptotic-like endonuclease(s). *Imunology & cell biology*, 76, pp. 526-534.

Stittelaar, K. *et al.* (2002). Vaccination against measles: a neverending story. *Expert review of vaccines*, 1, pp. 151-159.

Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. [Em linha]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610616>. [Consultado em 24/11/12].

Trinchese, F. *et al.* (2004). Cell cultures from animal models of Alzheimer's disease as a tool for faster screening and testing of drug efficacy. *Journal of Molecular Neuroscience*, 24(1), pp. 15-21.

Uphoff C. e Drexler H. (2002). Comparative antibiotic eradication of mycoplasma

infections from continuous cell lines. *In vitro cellular & developmental biology animal*, 38, pp. 86–89.

Vacanti, J. e Vacanti, C. (2007). *Principles of Tissue Engineering*. Londres, Elsevier.

Velicer, C. et al. (2009). Prevalence and incidence of HPV genital infection in women. *Sexually Transmitted Diseases*, 36, pp. 696-703.

Yamada, K. e Cukierman, E. (2007). Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, 130, pp. 601-610.

Yoon, Y. et al. (2010). Induction of Lysosomal Dilatation, Arrested Autophagy, and Cell Death by Chloroquine in Cultured ARPE-19 Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51, pp. 6030-6037.

Zhang, L. et al. (2009). The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Critical reviews in biomedical engineering*, 37, pp. 1-57.

Zieker, D. et al. (2013). Induction of tumor stem cell differentiation-novel strategy to overcome therapy resistance in gastric cancer. *Langenbeck's Archives Surgery*.

Ziegler, U. e Groscurth, P. (2004). Morfological features of cell death. *News Physiologic Science*, 19, pp. 124-128.